

TUMSAT-OACIS Repository - Tokyo University of Marine Science and Technology (東京海洋大学)

マイコスポリン様アミノ酸の機能性についての研究

著者	岸野 未来
学位名	修士（海洋科学）
学位授与機関	東京海洋大学
学位授与年度	2016
URL	http://id.nii.ac.jp/1342/00001510/

修士学位論文

マイコスポリン様アミノ酸の機能性についての研究

平成 28 年度

(2017 年 3 月)

東京海洋大学大学院

海洋科学技術研究科

食機能保全科学専攻

岸野 未来

第一章 緒言	1
第一節 マイコスポリン様アミノ酸 (MAA) の分布と化学構造について	1
第二節 MAA の作用について.....	3
第三節 MAA を含む水産食品資源とその機能.....	5
 第二章 MAA の精製	9
第一節 粗抽出物の調製	9
第二節 フォルチ法による脂溶性成分の除去	14
第三節 活性炭による水溶性成分の除去	18
第四節 HPLC による分離条件の検討と MAA の分取	24
 第三章 抗酸化能と機器分析による MAA の確認	30
第一節 DPPH ラジカル消去能による抗酸化能の確認	30
第二節 吸光度測定による吸収波長の確認	33
第三節 NMR による構造の確認.....	35
 第四章 総括	42
 謝辞	44
参考文献	45

第一章 諸言

第一節 マイコスポリン様アミノ酸 (MAA) の分布と化学構造について

紫外線は生物にとって有害であり、その波長域によって生物に与える影響が異なる。紫外線の生物学的な影響を評価する研究分野では、UV-A = 315～400 nm、UV-B = 280～315 nm、UV-C = 100～280 nm の分類が用いられている (IARC, 1992)。UV 領域の光の中で 280 nm よりも波長が短い UV-C は、成層圏のオゾン層により吸収され、地上にはほとんど到達しない。このため、現実には生物体にとって有害となるのは UV-B の一部と UV-A である (石倉ら 2002 : Dunlap et al., 1998)。DNA は 260 nm 付近、タンパク質は 280 nm 付近に吸収極大をもつことから、強い UV-B の照射を受けた生物は致死となる。

低緯度である熱帯地方では太陽光の光路長が短いことと赤道付近でのオゾン層が薄いことによって、中緯度地方と比較して強い紫外線が降り注ぐ (Smith et al., 1979)。太陽光線は光合成や物質代謝にとって欠くことのできないエネルギー源でもある。したがって生物は、紫外線の影響を受けずに、太陽光線から有益な波長のエネルギーを吸収しなければならない。陸上植物であるコケ、シダおよび種子植物では、UV-B がフラボノイド類の生合成を促進させ、このフラボノイド類が UV-B または UV-C を吸収する。フラボノイドは植物の表皮細胞の液胞内に蓄積しており、紫外線を吸収して光合成などの重要な機能を有する葉肉細胞を紫外線から保護するフィルター作用を持っている (近藤ら, 1994)。

藻類や魚類などの水生生物では、有害な紫外線から防御する物質として、マイコスポリン様アミノ酸（Mycosporine-like amino acid、以下 MAA と記載する）を、紫外線防御物質として産生している（田口, 1993）。MAA は、菌類で発見され、他に海藻や微細藻などが生産するマイコスポリン（mycosporine 図 1-1）にアミノ酸またはアミノアルコールが結合した構造の部分構造を有するアミノ酸類の総称である。MAA はシクロヘキセノンまたは、シクロヘキセニミン骨格にアミノ酸またはアミノアルコールを有するタイプに分けられる。

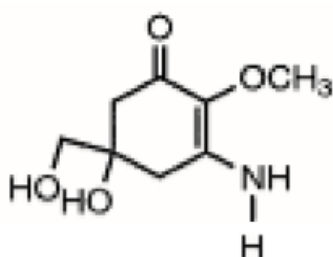


図 1-1 マイコスポリン

現在までに様々の生物群から約 20 種類の MAA が報告されている（Dunlap et al., 1998）。報告されている MAA のうち代表的なものの化学式と最大吸収波長（ λ_{\max} ）を図 1-2 にまとめた。

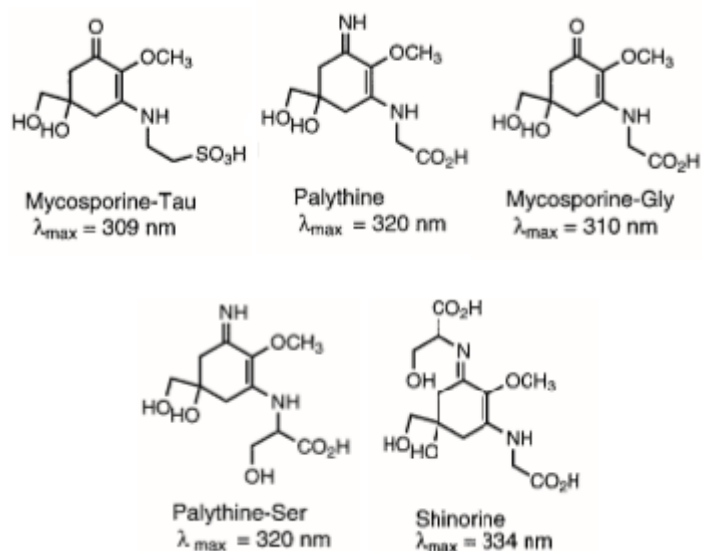


図 1-2 報告されている主な MAA の化学構造

第二節 MAA の作用について

MAA は紫外線吸収作用以外に、抗酸化物質として生物体内においての酸化ストレス防御の役割を果たす。例えば、サンゴ礁域に生息するイワスナギンチャク (*Palythoa tuberculosa*) 抽出物に、強い酸化阻害活性が報告されている (Dunlap et al., 1995)。また、脂質や組織ホモジネイトの過酸化を抑制作用も報告されている (Dunlap et al., 1998)。

海洋環境では熱帯サンゴ礁海域などの浅所に生育する生物や、前述したように低緯度の地域に生息している生物がもっとも紫外線を強く受ける。そのため、造礁サンゴなど生物には MAA が多く含まれており、生育深度が深くなるにつれ MAA 含量は減少することが明らかとなっている (Dunlap et al., 1998)。また、UV 照射が少ない領域のサンゴを UV 照射が多い領域に移すと、光障害や、成長速度を遅らせる原因ともなることが報告されている (Hoyer et al., 2001)。MAA が様々な生物から報告されているが、実際に MAA を生産しているのは、サンゴ個虫の細胞内に共生する *Symbiodinium* 属藻類 (過鞭毛藻) である。造礁サンゴや海産無脊椎動物、ホタテガイの卵巣や魚の目からも MAA が検出されているが、これらの動物には MAA を合成する能力はなく、食物連鎖や共生藻を通して取り込んだ藻類由来の MAA が体内に蓄積すると考えられている (Dunlap et al., 1995; 石倉ら, 2002; Sick et al., 2002)。ホタテガイから精製した MAA では、ヒト由来の培養繊維芽細胞に対して増殖促進作用を示した報告がある (独立行政法人水産総合研究センター, 2012)。

MAA の真の生産者は海藻類であるが、海藻の種類や生育環境によってもその生産量は変化する。褐藻類や緑藻類からはほとんど検出されておらず、主に紅藻類の多くの種から検出されている。(横山ら 2007)。中でも、スサビノリ (*Pyropia yezoensis*)、アマクサノリ (*P. tensera*)、ウップルイノリ (*P. pseudolinearis*)、壇紫菜 (*P. haitanensis*)などに代表されるアマノリ属藻類は東アジア地域で大量に栽培されていることから、MAA の抗酸化作用を有する化合物の原料として期待されている。さらに、近年、スサビノリ生育環境の悪化により、ノリの色落ちや品質低下がもたらされており、商品価値の低い「色落ちノリ」や「下等ノリ」が大量に廃棄されている。このような廃棄ノリに新た

な価値を見出し、有効利用する試みもなされている（財団法人佐賀県地域産業支援センター，2008）。

そして生物に生産させた MAA を利用する方法についても報告されている。例えば、ネンジュモ目ノストク属の藍藻に紫外線を照射しながら培養する方法（榊原ら，2007）などや、マイクロコッカス属に属した MAA を生産する能力を有する微生物に培養し、培養物中から MAA を分取する方法などが報告されている（荒井ら，1994）。

第三節 MAA を含む水産食品資源とその機能性

前節で述べたとおり、MAA は多様な機能性を有する。私たちが MAA を含む海産物を摂取した際にも、生体内においてその機能性が発現されることが期待されている。MAA を、外用の繊維芽細胞増殖促進剤、抗酸化機能を有した化粧品、日焼け止めクリームなどに応用することが可能であることが考えられている。しかし、精製された MAA を用いて行われた実験は *in vitro* で評価されたものが大部分であり、MAA が生体内に取り込まれたあとの作用を調べたものは少ない。一方で、マウスやヒトにおいては外用による評価試験にとどまり、食品として摂取した場合にどの程度の作用が期待できるのかを示す実験結果は報告されていない。

本研究では、水産食品資源から精製した MAA を用いて生体内での作用を確認することを目指して、その精製を進めることとした。本節では、今回用いたスサビノリとアメフラシの卵について紹介する。

スサビノリ (*Pyropia yezoensis*) とは、アマノリ属に属する紅藻類である。一般的に食べられている「海苔」の原料である。



図 1-3 スサビノリ（環境省）

一般に海藻類には様々な生理作用があることが知られており、コレステロール低下作用（金田ら, 1963:1965:辻ら, 1975）や血圧低下作用（Ren et al., 1994）や抗腫瘍活性（中沢ら, 1974）などが報告されている。特に、藻類由来の多糖類には種々の生物活性が報告されている。スサビノリの粘質多糖類ポルフィランにも血清コレステロール低下作用（Ren et al., 1994）や抗腫瘍作用（Noda et al., 1989:Osumi, 1998）が見出されている。

このほかにもスサビノリには、Porphyra-334、Shinorin、Palythine などの MAA が比較的高含量で存在する（Takano et al., 1979）。これらスサビノリの MAA に関しても、紫外線吸収作用（辻野ら, 1961）、質過酸化抑制作用などが報告されている（前田ら, 2006）。

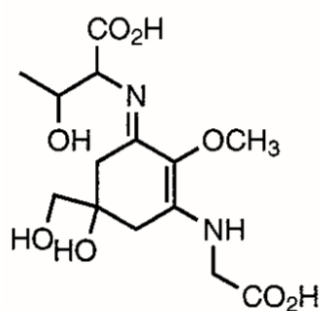


図 1-4 porphyra- 334 ($\lambda_{\max} = 334 \text{ nm}$)の化学構造

アメフラシ (*Aplysia krodai*) は、日本各地、韓国、中国、朝鮮半島などの北西太平洋沿岸に分布する。海岸の潮溜まりや沿岸の岩礁域の転石帯などに生息する。体は軟らかく長卵形であり、外敵に襲われたり、体に強く触れると紫色の粘液質の汁を分泌する。



図 1-5 アメフラシ



図 1-6 アメフラシの卵

アメフラシの卵は小さく、直径約 100 μm で、卵殻という丸い袋一つに 15~30 個以上が存在している。この卵殻は連なって卵紐という長い紐状となり、更にそれが絡まって塊状となる。この塊は「海そうめん」と呼ばれる。産卵直後の卵紐は鮮やかな黄色だが、卵の発生が進むにつれて肝臓

が形成され、次第に褐色を帯びるようになる。アメフラシは一般には食用とされていないが島根県隠岐島や、鹿児島県徳之島、千葉県南部などでは身を茹でて、食用にする地域がある（藤原ら、2015）。

ジャノメアメフラシに、様々な海藻を給餌すると、皮膚や卵中に **MAA** が蓄積することが報告されている（Carefoot et al., 2000）。アメフラシ類はアオサなどの様々な海藻類を摂食しているため、様々な種類の **MAA** を含む可能性があり、**MAA** の供給源として有用だと考えた。またホタテガイでは卵巣への蓄積が報告されていることから、卵塊においてその含有量が比較的高いことが期待されることから、アメフラシの卵も **MAA** を含む有用な資源だと考えた。

第二章 MAA の精製

本章では、MAA を含むことが報告されているスサビノリとアメフラシの卵から、文献の方法を参考にして MAA の精製を実施した。各段階では MAA の特徴である UV=330 nm の吸光度と抗酸化活性を指標として精製を進めた。

第一節 粗抽出物の調製

はじめに

MAA の抽出は加温した水またはアルコールで実施されている。本節では常法によりスサビノリおよびアメフラシの卵から MAA を含む粗抽出物を調製し、その性質を確認した。

方法

スサビノリは神戸漁港から 2012 年に提供された生海苔を凍結保存し、解凍したものを原料とし、アメフラシの卵は 2014 年 5 月、2015 年 5 月に神奈川県江奈湾の潮間帯で採集したものを使用した。実験室の冷蔵庫に一晩保存し、翌日に表面に残った水分を拭き取った。できるだけ産卵から時間の経過をしていない、アメフラシの卵を試料として選び、褐色の卵は紫外線に長時間晒されていると考えたため排除したものを原料とした。

湿重量を秤量した生海苔を 3 L 三角フラスコに入れ、メタノール (MeOH、関東化学株式会社)：蒸留水=1：1 の割合の溶媒にて抽出した。抽出は、45 °C に設定したインキュベーター (山本化学株式会社) 内にて、2 時間行った。抽出後、ブフナー漏斗 (ULVAC DA-30S) に濾紙を敷いて吸引濾過を行い、抽出液を得た。残渣を再度 3 L 三角フラスコに集め、MeOH：蒸留水=8：2 の条件でインキュベーター内にて抽出した。インキュベーターの温度設定は、一回目の抽出温度と同じに設定した。一回目の抽出と同じ方法で吸引濾過を行い、抽出液を得た。得られた 2 つの抽出液を一つにまとめ、これを抽出液全量とした。

抽出液をナスフラスコに集め、ロータリーエバポレーター（N-1110 V、東京理化器機）にて減圧乾固をした。濃縮後、凍結乾燥機（FD-5 N、東京理化器機）に 12 時間設置し、水分を完全に飛ばした。凍結乾燥機で乾燥した試料を集め、薬さじを使って粉末状にした。これを本実験で用いる粗抽出物サンプルとして、重量および UV=330 nm の吸光度を測定し、回収率を計算した。

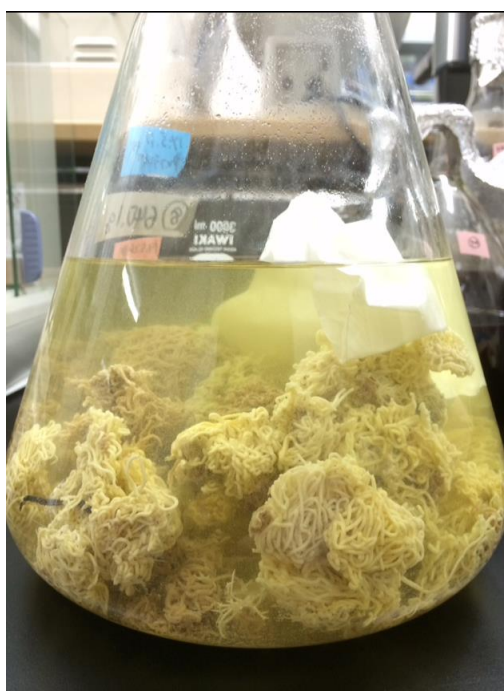


図 2-1-1 今回サンプリングしたアメフラシの卵

結果・考察

得られたスサビノリ粗抽出物とアメフラシの卵の粗抽出物の回収率を表 2-1-1、2-1-2 に示した。含水サンプルからの回収率は、スサビノリでは 4.31 % 、アメフラシの卵では 3.98 % で同程度であった。スサビノリ粗抽出物の吸光度を図 2-1-2 と表 2-1-3 に示した。アメフラシの卵の粗抽出物の吸光度を図 2-1-3 と表 2-1-4 に示した。図 2-1-2 と 2-1-3 のスペクトルより、両方のサンプル原料において MAA の特徴の一つである 330 nm 付近の吸収を確認することができた。また、最大吸収波長における吸光度の強さを比較すると、同じ濃度の比較では、アメフラシの卵よりもスサビノリの粗抽出物の方が約 8 倍吸収が大きいことが分かった。ここで、330 nm 付近における UV 吸収が

全て MAA によるものだと考えた場合、スサビノリがより有力な MAA の原料だと推定することができる。さらにアメフラシの卵では、330 nm 付近よりも 260 nm 付近の吸収が高いことから別の成分の影響が大きいことも推定される。しかし、粗抽出物の段階ではこの 330 nm 付近における吸収が MAA 由来のものであるとは言えないため、さらに精製をすすめる必要があると考えられる。

表 2-1-1 得られたスサビノリの粗抽出物の重さと回収率

スサビノリ・湿潤 (g)	粗抽出物 (g)	回収率 (%)
2660.12	114.73	4.31

表 2-1-2 得られたアメフラシの卵の粗抽出物の重さと回収率

アメフラシの卵 (g 湿重量)	粗抽出物 (g)	回収率 (%)
6691.07	265.96	3.98

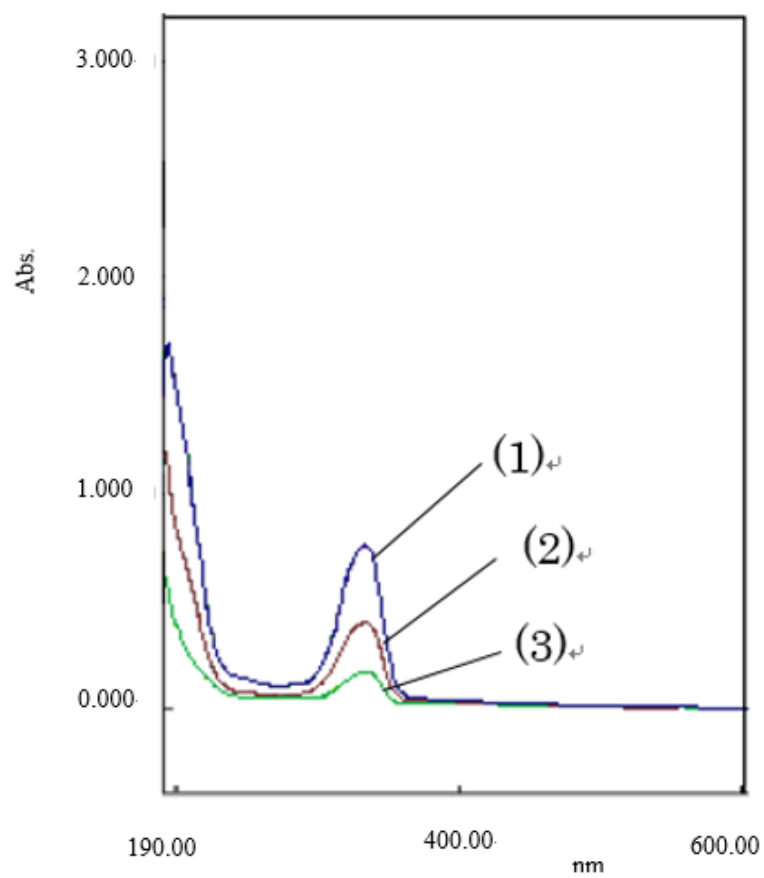


図 2-1-2 スサビノリ粗抽出物の吸光スペクトル

表 2-1-3 スサビノリ粗抽出物の波長と吸光度

サンプル番号	濃度 (mg / mL)	波長 (nm)	吸光度
(1)	2×10^{-5}	333.5	0.755
(2)	1×10^{-5}	333.5	0.370
(3)	5×10^{-6}	333.5	0.188

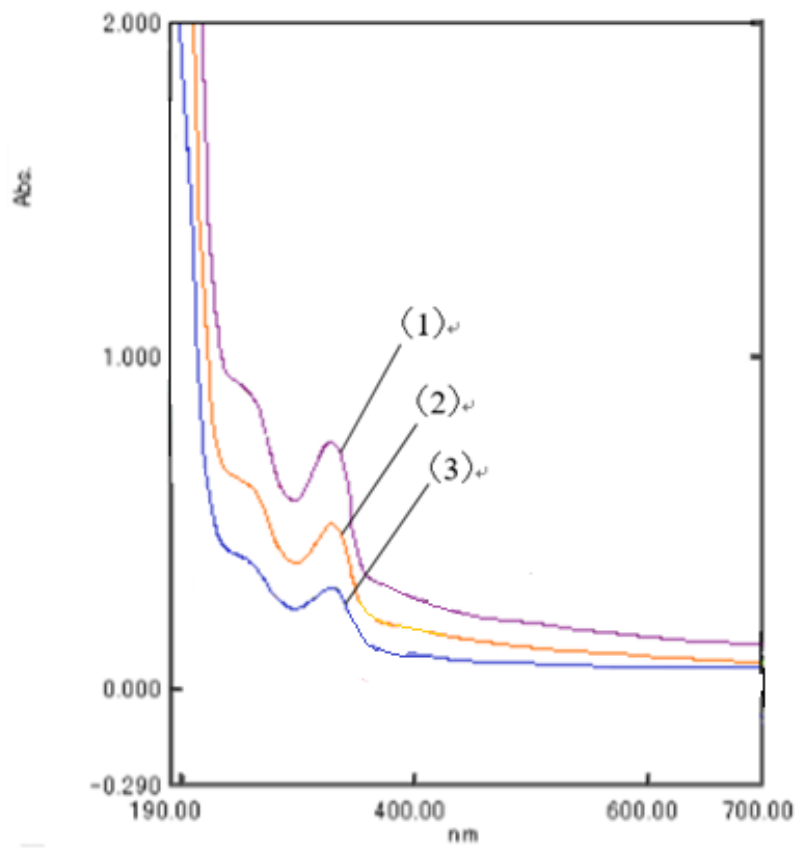


図 2-1-3 アメフラシの卵粗抽出物の吸光スペクトル

表 2-1-4 アメフラシの卵粗抽出物の波長と吸光度

サンプル番号	濃度 (mg / mL)	波長 (nm)	吸光度
(1)	16×10^{-4}	328.5	0.749
(2)	8×10^{-4}	327.0	0.504
(3)	4×10^{-4}	328.5	0.302

第二節 フォルチ法による脂溶性成分の除去

はじめに

MAA は水溶性成分であるが、スサビノリにはパラフィンやスルホリピド、グリセログリコリピドなどの脂質、クロロフィルなどの色素といった脂溶性成分が含まれている (Sakamoto et al., 1978)。脂溶性成分の除去には、有機溶媒による抽出が用いられることが多く、MAA の精製に関してもクロロホルム (Caroline et al., 2015)、ジクロロメタン (石原ら, 2012) などが用いられている。本研究では Folch 法 (Folch et al., 1956) を用いた文献 (Caroline et al., 2015) に従って、粗抽出物から脂溶性成分の除去を行った。

方法

スサビノリ粗抽出物サンプルをファルコンチューブに入れ、蒸留水を加えよく攪拌した。攪拌後、クロロホルム (関東化学株式会社) と MeOH 混合液を加え、よく攪拌した。クロロホルムと蒸留水、MeOH の割合は、2:1:1 とした。溶媒は、サンプルの 10 倍量を用いた。約 30 分ほど放置し安定させ、二層のうち上層のみをガラスピペットで汲み取った。この上層を、ナスフラスコに移した。この操作を 5 回 (上層の色が消えるまで) 繰り返し、スサビノリ粗抽出物サンプルの脂溶性成分を除去した水溶性成分を得た。

ナスフラスコに集めた水溶性分画物をエバポレーターで減圧濾過し、凍結乾燥機にて試料の水分を除去した後に、分画物の最終重量を測定した。MAA の指標を確認するため、サンプルを一定濃度に蒸留水で溶解し、3 mL 石英セルに移し、吸光度計 (UV-1600 PC、島津) にて 330 nm 付近の波長を測定した。

結果・考察

スサビノリ粗抽出物とアメフラシの卵の粗抽出物からフォルチ分画によって得られた、水溶性画分（フォルチ法分画物）の重量と、粗抽出物を 100% としたときの回収率を表 2-2-1、2-2-2 に示した。スサビノリでは 80.4 % 、アメフラシの卵では 72.6 % であり、粗抽出物の 8 割程度が水溶性であることが示された。スサビノリに含まれている多糖類ポルフィランの含有量は 30 % 程度（中川ら、1998）と報告されていることから、残りの 50 % に MAA や塩類などの水溶性低分子が含まれていると考えられる。また、フォルチ法により得られた水溶性画分の波長と吸光度は、スサビノリに関しては図 2-2-1、表 2-2-3 に、またアメフラシの卵に関しては図 2-2-2、表 2-2-4 に示した。

これらの結果より、330 nm 付近に最大吸収波長を各サンプルで確認することができた。しかし、さらに目的物質を精製する必要があると考えられた。

表 2-2-1 スサビノリのフォルチ法分画物の重量と回収率

スサビノリ粗抽出物 (g)	フォルチ法分画物 (g)	回収率 (%)
114.73	92.22	80.4

表 2-2-2 アメフラシの卵のフォルチ法分画物の重量と回収率

アメフラシの卵粗抽出物 (g)	フォルチ法分画物 (g)	回収率 (%)
115.34	83.78	72.6

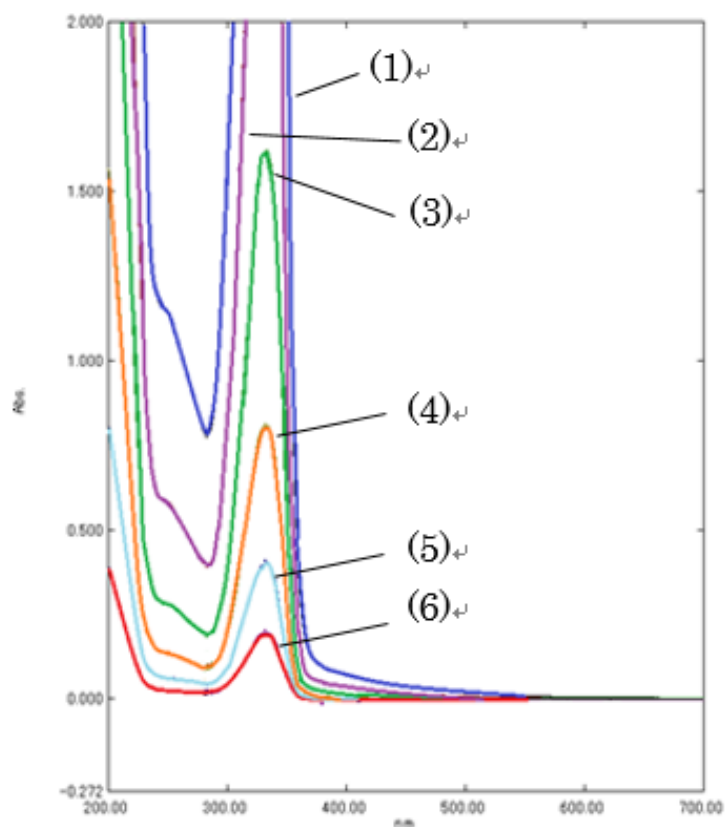


図 2-2-1 スサビノリのフォルチ法分画物の吸収スペクトル

表 2-2-3 スサビノリのフォルチ法分画物の波長と吸光度

サンプル番号	濃度 (g/mL)	波長 (nm)	吸光度
(1)	2.5×10^{-3}	337.0	Over
(2)	1.25×10^{-3}	332.0	3.436
(3)	0.625×10^{-3}	333.0	1.616
(4)	0.3125×10^{-3}	332.5	0.807
(5)	0.15625×10^{-3}	332.0	0.399
(6)	0.078125×10^{-3}	332.5	0.195

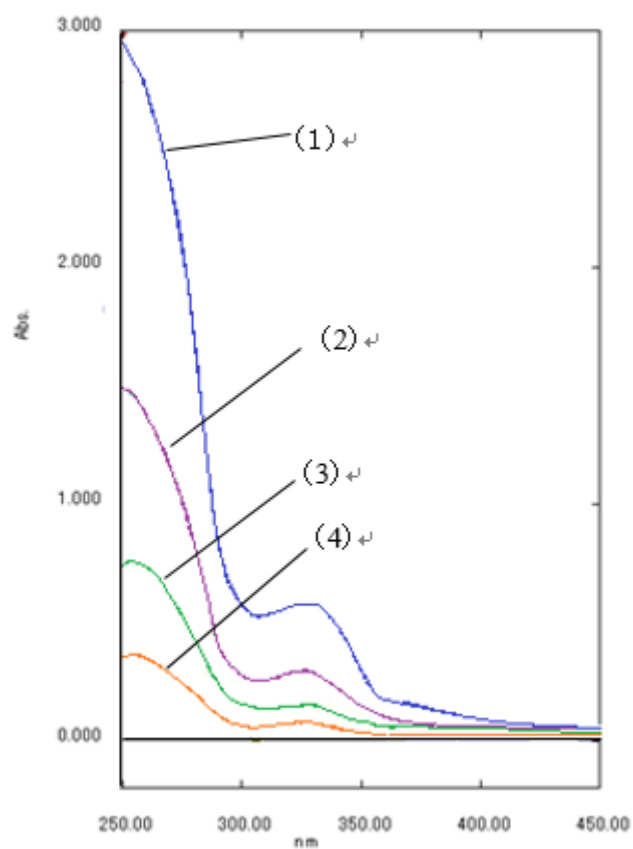


図 2-2-2 アメフラシの卵のフォルチ法分画物の吸収スペクトル

表 2-2-4 アメフラシの卵のフォルチ法分画物の波長と吸光度

サンプル番号	濃度 (g/mL)	波長 (nm)	吸光度
(1)	2.5×10^{-3}	325.4	0.578
(2)	1.25×10^{-3}	325.8	0.282
(3)	0.625×10^{-3}	324.6	0.157
(4)	0.3125×10^{-3}	326.8	0.070

第三節 活性炭による水溶性成分の除去

はじめに

前節で得られた水溶性成分は、MAA 以外にも多糖類、有機酸類、アミノ酸類、塩類など多くの成分を夾雑している。これらを除去するためには活性炭によるカラムクロマトグラフィー、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、などで処理することが必要である（DIC 株式会社, 2007）。例えば活性炭などは非極性吸着材であり、非極性分子を選択的に吸着する性質を示す。よって、極性の弱い有機物を吸着・除去させるには、表面が疎水性である活性炭などを用いることが有用だと考えられる。また、ベンゼンのような芳香族化合物に対しても強い親和力を示す（森崎ら, 1967）。本研究では、活性炭を用いた文献（DIC 株式会社, 2007）に従って、前節で得られた水溶性成分から、MAA を精製することを目的とした。

方法

粉末状の活性炭（関東化学株式会社）は、フォルチ法分画物の 10 倍の量を用いた。カラムクロマトへ用いる前に、混在する微粉末を除去する目的で、以下の手順でデカンテーションを行った。すなわち活性炭量に対して 4 倍量の蒸留水を加え、よく攪拌し 15 分放置した。沈殿物を得るために、15 分後に微粉末の浮遊する上澄みを廃棄した。みだけを取った。このデカンテーションの作業を繰り返した。

直径 4 cm 、高さ 60 cm のガラスクロマトグラフィーカラムに、デカンテーションした活性炭を充填した。活性炭を安定させるために、100 mL の蒸留水をカラムに流し入れた。フォルチ法分画物を少量の蒸留水で溶解し、カラムにアプライし、吸着させた後に、10% MeOH 溶液、50% MeOH 溶液、80% MeOH 溶液の順番でカラムに流し入れて溶出させた。各溶液の量は、750 mL とした（3 vol）。カラムを通して溶出した、それぞれの溶液を分画した。

それぞれの分画物をエバポレーターにて減圧乾固し、凍結乾燥機にて水分を完全に飛ばした。
10% MeOH 溶出画分、50% MeOH 溶出画分、80% MeOH 溶出画分の重量を合わせ、吸光度測定機にて 330 nm 付近の波長を確認した。3 ml 石英セルを用いた。

またアメフラシの卵の活性炭カラム吸着による精製では、ガラスクロマトグラフィーカラムではなく、ブフナー漏斗を用いて吸引濾過による溶出方法で行った。このときの濾紙は、保留粒形 6 μm を用いた。活性炭量、溶出した溶液はガラスクロマトグラフィーカラムのときと同じ量で行った。

結果・考察

フォルチ法分画物を活性炭カラムにかけたときに得られた、10% MeOH 溶出画分、50% MeOH 溶出画分、80% MeOH 溶出画分のスサビノリの重量と回収率を表 2-3-1 に示し、アメフラシの卵の重量と回収率を表 2-3-2 に示した。

スサビノリは 20.03 g のフォルチ法画分を活性炭カラムにかけた。また、アメフラシの卵は 20.02 g のフォルチ法画分を活性炭カラムにかけた。各サンプルを活性炭に溶出した画分の吸光度の結果を図 2-3-1、2-3-2 と表 2-3-3、2-3-4 に示す。スサビノリとアメフラシの卵ともに、80% MeOH 溶出画分の濃度だけが違うが、10% MeOH 溶出画分と 50% MeOH 溶出画分の濃度に合わせると、最大吸収波長が確認できなかったため、半分の濃度で測定した。

図 2-3-1、2-3-2 と表 2-3-3、2-3-4 より、330 nm 付近の最大吸収波長が確認できたのは 80% MeOH 溶出画分と 50% MeOH のみ溶出画分であった。しかし 330 nm 付近の吸光度の数値を比較すると、80% MeOH 溶出画分の方が高い数値が確認できた。MAA 濃度が高ければ、330 nm 付近の最大吸収波長も高くなる。よって、80% MeOH 溶出画分に目的物質が含まれていると現時点で考えられる。この時点で、各サンプルの粗抽出物の量と 80% MeOH 溶出画分の量を表 2-3-5 にまとめた。

表 2-3-1 スサビノリの各溶出画分の重量と回収率

	10% MeOH	50% MeOH	80% MeOH
	溶出画分	溶出画分	溶出画分
重量 (g)	0.80	0.43	0.18
回収率 (%)	4.0	2.1	0.9

表 2-3-2 アメフラシの卵の各溶出画分の重量と回収率

	10% MeOH	50% MeOH	80% MeOH
	溶出画分	溶出画分	溶出画分
重量 (g)	14.14	2.69	0.29
回収率 (%)	70.6	13.4	1.5

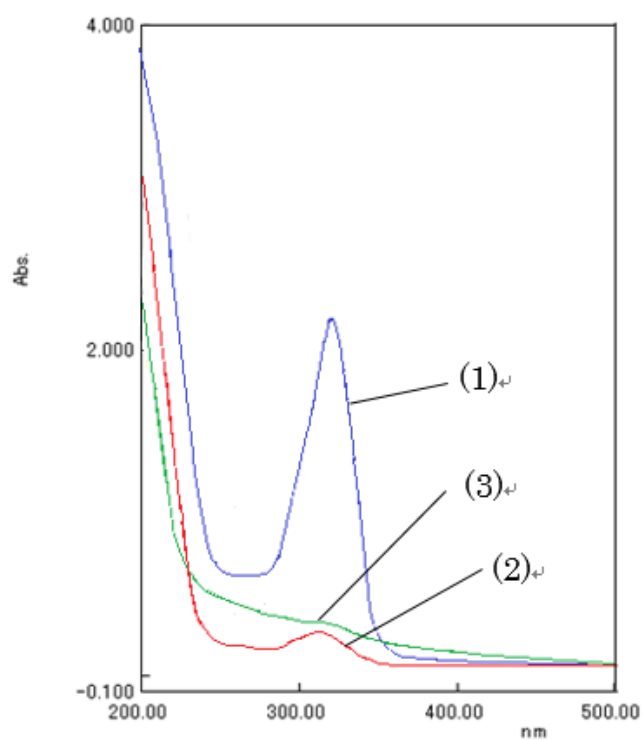


図 2-3-1 スサビノリの活性炭から溶出した各分画物の吸収スペクトル

表 2-3-3 スサビノリの活性炭から溶出した各分画物の波長と吸光度

サンプル	濃度 (g/mL)	波長 (nm)	吸光度
(1) 80%MeOH 溶出画分	1.67×10^{-3}	320	2.251
(2) 50%MeOH 溶出画分	3.33×10^{-3}	314.5	0.267
(3) 10%MeOH 溶出画分	3.33×10^{-3}	測定不可	測定不可

表の 10% MeOH (3) 溶出画分では、最大吸収波長を確認することができなかった。よって、波長と吸光度を測定不可と記した。

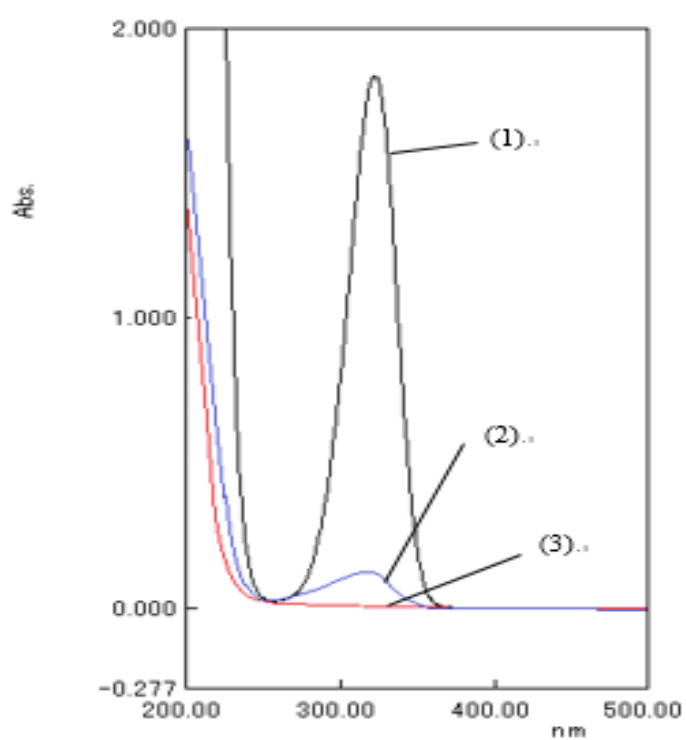


図 2-3-2 アメフラシの卵の活性炭から溶出した各分画物の吸収スペクトル

表 2-3-4 アメフラシの卵の活性炭から溶出した各分画物の波長と吸光度

サンプル	濃度 (g / mL)	波長 (nm)	吸光度
(1) 80%MeOH 溶出画分	1.67×10^{-3}	323	1.831
(2) 50%MeOH 溶出画分	3.33×10^{-3}	328.5	0.125
(3) 10%MeOH 溶出画分	3.33×10^{-3}	測定不可	測定不可

表の 10% MeOH 溶出画分 (3) では、最大吸収波長を確認することができなかった。よって、波長と吸光度を測定不可と記した。

表 2-3-5 各サンプルの粗抽出物および 80% MeOH 溶出画分の量

サンプル	スサビノリ	アメフラシの卵
粗抽出物	2660.12 g	6691.07 g
80% MeOH 溶出画分	1.40 g	2.80 g

第四節 HPLC による分離条件の検討と MAA の分取

はじめに

本節では、第三節の操作により得られた、80% MeOH 溶出画分について、HPLC を用いて MAA の単離を試みた。以下、スサビノリとアメフラシの卵について別々に記す。

スサビノリの方法

スサビノリ 80% MeOH 溶出画分 0.27 mg に 1000 μ L 蒸留水を加えよく攪拌し、そのうちの 37 μ L を別のバイアルに移し入れた (9.8mg / 37 μ L)。さらに各分離条件における移動相を用いて 1/5 希釈した (1.96 mg / 37 μ L)。遠心分離機で遠心後、上清を試料とした。

分取に先立って、各々 2 μ L (0.106 mg) の試料を用いて、条件検討を実施した。分析条件 1 として、カラムは ODS-HG 5 ϕ 4.6 / 250 mm (野村化学株式会社)、流速は 0.7 mL / min、波長は 330 nm、移動相は 5 % MeOH とした。分析条件 2 として、カラム RPAQUEOUS ϕ 4.6 / 250 mm (野村化学株式会社)、波長は 330 nm、移動相は H₂O とし、他の条件は条件 1 と同じにした。

スサビノリの結果・考察

HPLC によって分析を行った結果を、図 2-4-1、2-4-2 に示した。各ピークの保持時間が大きいことから分取には条件 2 が適切だと判断した。したがって、RPAQUEOUS カラム、移動相 H₂O を用いる条件で MAA の単離が可能だと考えられる。なお、この条件では表 2-4-1 に示したように 4 本のピークを確認することができたため、数種類の MAA が含まれると推定した。

目的物質を効率よくえるために目的物質を効率よく得るために、カラムを RPAQUEOUS ϕ 20.0 / 250 mm (野村化学株式会社) にスケールアップして分取を行った。流速は 7.5 mL / min、波長は 330 nm とし、移動相は H₂O、インジェクション量は 2.119 mg / 40 μ l とした。

このときのクロマトグラムを図 2-4-3 に示した。また、分取できたサンプル量を表 2-4-2 に示した。
このサンプルには 5 つの成分が含まれると、表 2-4-2 の結果から判断できた。スサビノリの分取で
得られたフラクションは、S①～S⑤ とした。

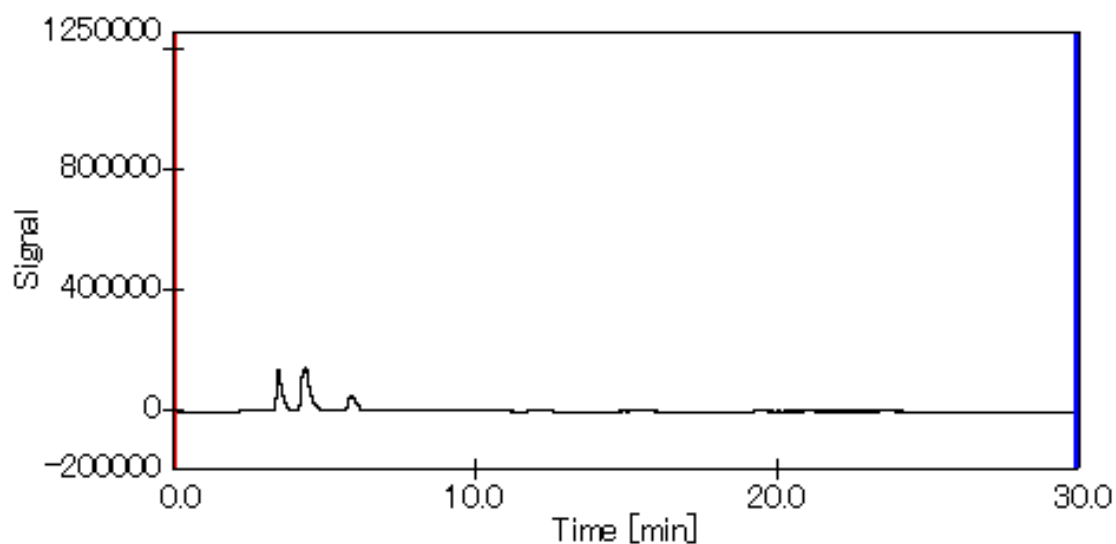


図 2-4-1 HPLC 分析により得られたクロマトグラム

カラム: ODS-HG 5, ϕ 4.6 / 250 mm

条件: 0.7 mL / min、330nm、5% MeOH、

サンプル: スサビノリ 80% MeOH 溶出画分, 2 μ l インジェクション

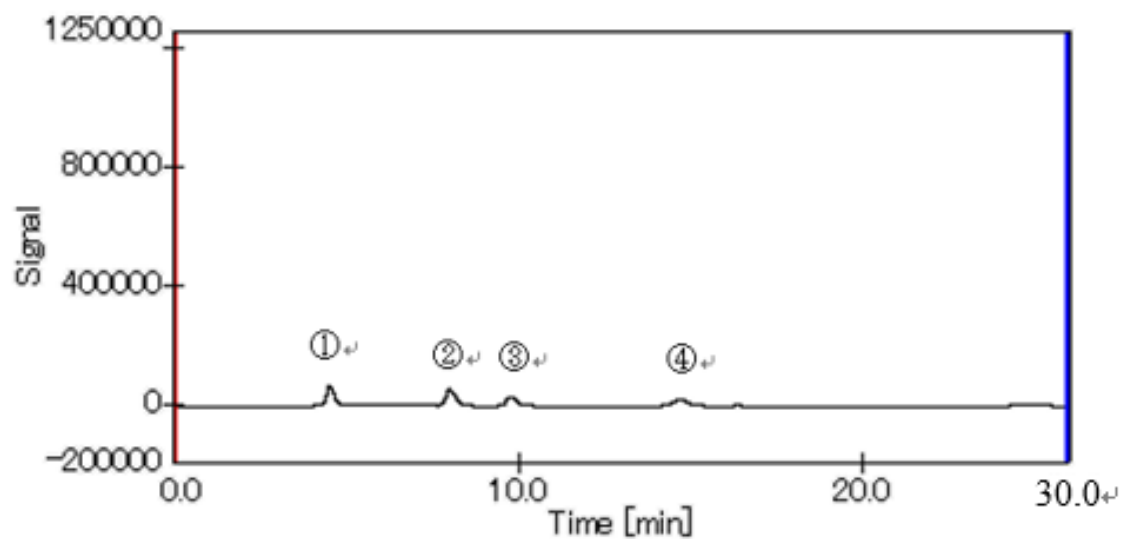


図 2-4-2 HPLC 分析により得られたクロマトグラム

カラム: RPAQEUEOUS, ϕ 4.6 / 250 mm

条件: 0.7 mL / min、330nm、H₂O

サンプル: スサビノリ 80% MeOH 溶出画分, 2 μ L インジェクション

表 2-4-1 各フラクションの保持時間

フラクション No.	保持時間 (分)
①	4.53
②	8.03
③	9.81
④	14.69

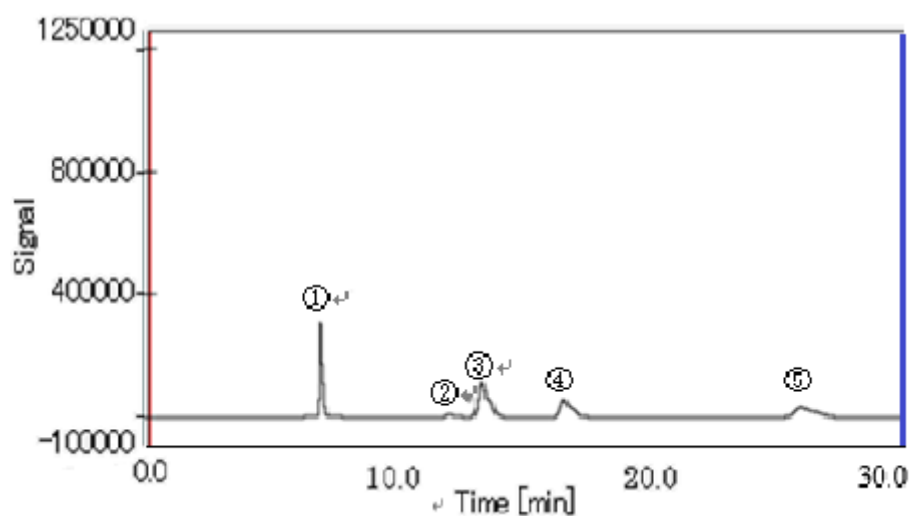


図 2-4-3 HPLC 分析により得られたクロマトグラム

カラム:RPAQEUEOUS, ϕ 20.0 / 250 mm

条件:7.5 mL / min、330nm、H₂O

サンプル:スサビノリ 80% MeOH 溶出画分、40 μ L インジェクション

表 2-4-2 各フラクションの保持時間と重量

フラクション No.	保持時間 (分)	重さ (mg)	回収率 (%)
S①	6.86	0.7	33.0
S②	12.29	0.2	9.4
S③	13.14	0.3	14.2
S④	16.57	0.5	23.6
S⑤	26.12	0.3	14.2

アメフラシの卵の方法

スサビノリでの分析条件を用いてアメフラシの卵 80% MeOH 溶出画分 0.094 mg / 2 μ l をインジェクションした。すなわちカラムは、AQUEOUS ϕ 4.6 / 250 mm 、流速は 0.7 ml / min 、波長は 330 nm 、移動相は H₂O (0% MeOH)とした。図 2-4-4 に示したとおり、3 つのピークが確認されたことから、アメフラシの卵から得られた 80% MeOH 溶出画分についても、この条件で分取を行うこととした。目的物質を分取するための条件は、カラムは AQUEOUS ϕ 20.0 / 250 mm 、流速は 7.0 mL / min、波長は H₂O、インジェクション量は 85 mg / 2 μ l とした。

アメフラシの卵の結果・考察

アメフラシの卵 80% MeOH 溶出画分の HPLC 分析結果を図 2-4-4 に示す。また、分取した結果を図 2-4-5、表 2-4-3 に示す。このときのクロマトグラムは図 2-5-5 に示した。HPLC にて分析したところ、330 nm で 3 つのピークが確認でき、3 つのフラクションを分取することができた (表 2-4-3)。アメフラシの卵の分取で得られたフラクションは、A①～A③ とした。

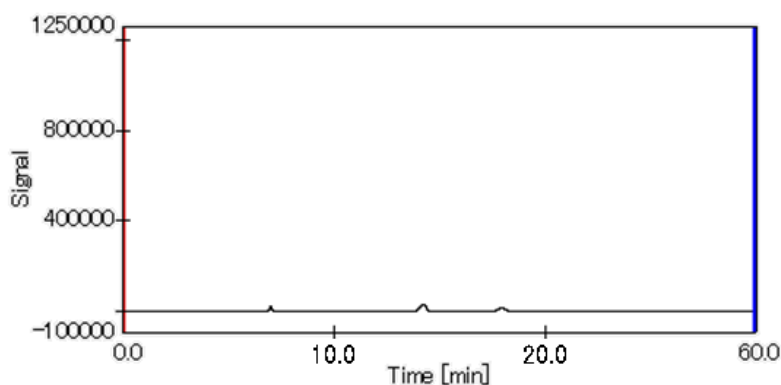


図 2-4-4 HPLC 分析により得られたクロマトグラム

カラム: PRAQUEOUS, ϕ 4.6 / 250 mm

条件: 0.7 mL / min、330nm、H₂O

サンプル: アメフラシの卵 80% MeOH 溶出画分、2 μ L インジェクション

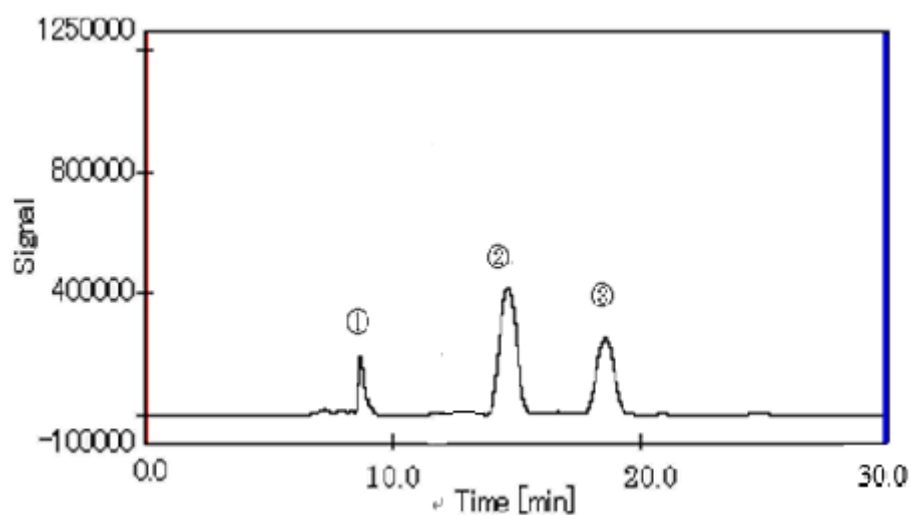


図 2-4-5 HPLC 分析によって得られたクロマトグラム

カラム:PRAQUEEUS, ϕ 20.0 / 330 mm

条件:7.5 mL / min、330nm、H₂O

サンプル:アメフラシの卵、40 μ l インジェクション

表 2-4-3 HPLC 分析によって得られたピークの保持時間と重さ

フラクション No.	保持時間 (分)	重さ (mg)
A①	8.57	0.3
A②	14.64	1.1
A③	18.57	0.8

第三章 抗酸化能と機器分析による MAA の確認

MAA には抗酸化作用があると緒言で述べてきた。HPLC の分取で得ることができた MAA に抗酸化能があるのかどうか確認するために、DPPH ラジカル消去能と、生体内での抗酸化能の実験を行った。

第一節 DPPH 溶液による抗酸化能の確認

はじめに

ジフェニルピクリルヒドラジル (DPPH) は、安定な人工的なラジカルであり、生体内には存在しない物質である。DPPH の構造の不対電子が他の物質と反応しやすい。この *in vitro* での反応から、ラジカル消去能を評価することができる (図 3-1-1)。前章において HPLC 分取で得られた 8 つのサンプルについて、DPPH ラジカル消去能を測定し、異なる MAA のラジカル消去能の強さを確認した。

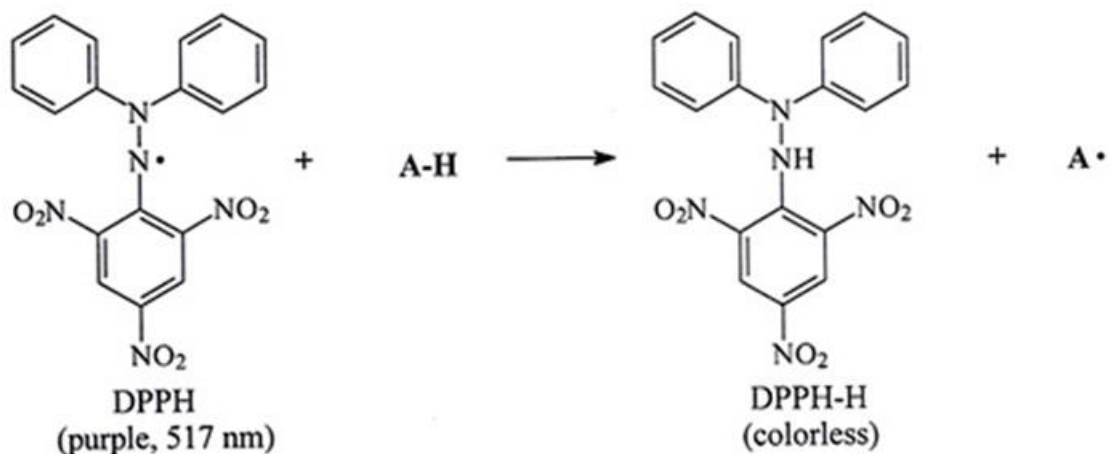


図 3-1-1 DPPH によるラジカル消去能の機構

方法

スサビノリ、アメフラシの卵を原料として、HPLC で分取して得られたサンプルを、1 mg / 1mL に調製し、96 ウェルマイクロ穴プレート（ウェル番号 H の列）に 50 μ L ずつ入れた。ウェル G の列にはサンプル 50 μ L と蒸留水 50 μ L を入れてピペットでよく混合した。この 100 μ L の混合液から 50 μ L のみを取り、ウェル F の列に移した。さらに、同様の手順で A の列まで 8 段階希釈した。次に各ウェル（液量は 50 μ L）に DPPH 溶液を 100 μ L ずつ入れ混合し、液量を 150 μ L にした。また、コントロールとして蒸留水 50 μ L と DPPH 溶液 100 μ L のウェルを作成した。各ウェルに溶液を準備した後、約 20 分安定させマイクロプレートリーダー（エックスバイオ）で 490 nm の吸光度を測定した。DPPH 溶液（東京化成工業株式会社）は 0.004 mg / mL MeOH の濃度で調製し、冷蔵庫に保存した。

結果・考察

スサビノリ 80% MeOH 溶出画分、アメフラシの卵溶出画分を HPLC にて分取した各サンプル（S①～S⑤、A①～A③）の DPPH ラジカル消去能の結果を図 3-1-2, 3-1-3 に示した。サンプルの終濃度は、ウェル H の列が最も高く、3.33 μ g / mL となる。

図 3-1-2、3-1-3 より、スサビノリ HPLC 分取画分では S③が、アメフラシの卵 HPLC 分取画分では A①が強力な DPPH ラジカル消去能を示した。スサビノリとアメフラシの卵のラジカル消去能を比較すると、スサビノリのサンプルの MAA が多く含まれていることが推定された。

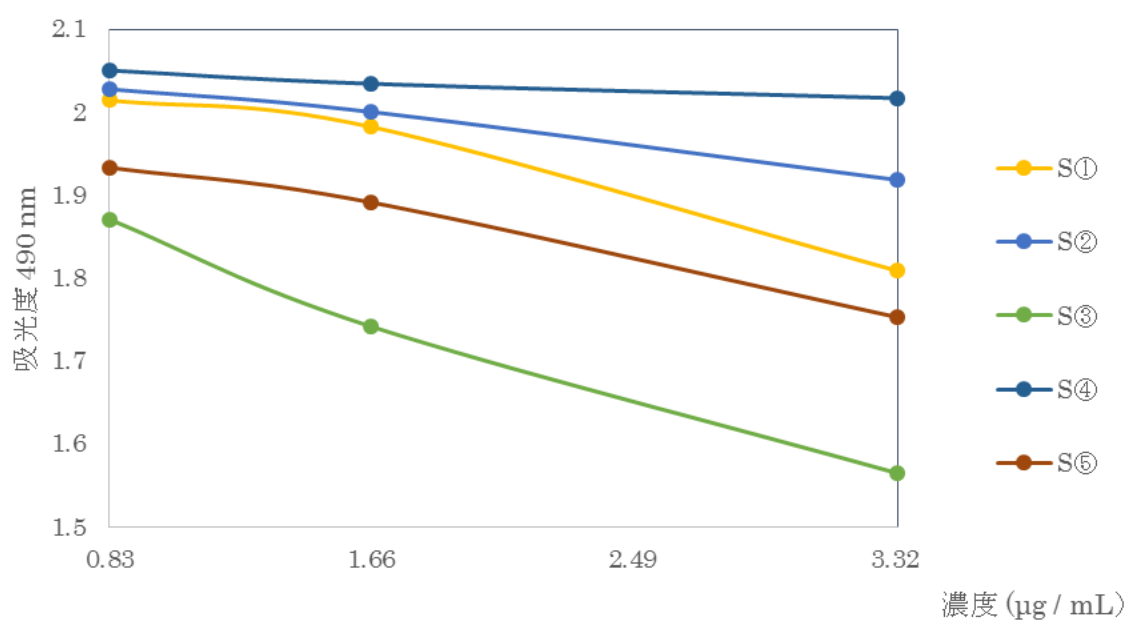


図 3-1-2 スサビノリ HPLC 分取 ラジカル消去能

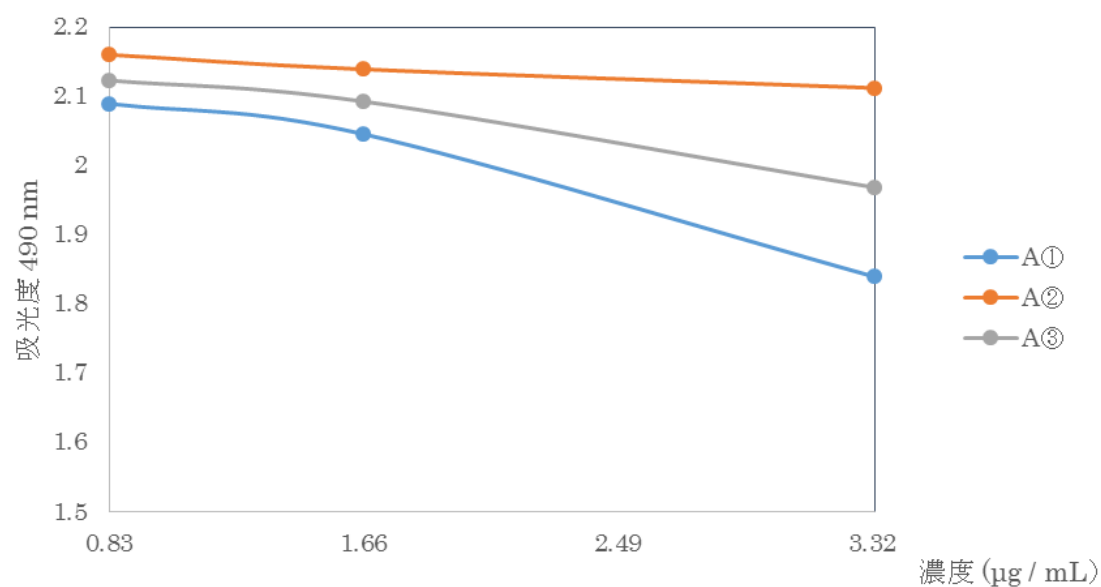


図 3-1-3 アメフラシの卵 HPLC 分取 ラジカル消去能

第二節 HPLC で分取した、各フラクションの吸光度測定

はじめに

MAA は 330 nm 付近に最大吸収波長を持つため、HPLC で分取した各ピークを吸光度計にて測定し、330 nm 付近に最大吸収波長を有するかどうか確認することとした。前節においてサビノリに MAA が多く含まれていることが推定されたため、本節では S①～S⑤のみを扱った。

方法

各サンプルの濃度を 0.2mg / mL に合わせて水溶液を調製し、吸光度計にて、スペクトルおよび吸光度を測定した。

結果・考察

図 3-2-1、表 3-2-1 より、各ピークで 330 nm 付近に最大吸収波長をみることができた。この結果から、S③の最大吸収波長が一番大きいことが分かった。つまり、330nm 付近に最大吸収波長を持つ物質が S③に多く含まれていると考えられる。

また DPPH ラジカル消去能の結果でも、S③のラジカル消去能が高かったため、この S③に MAA が大量に含まれていると考えられた。

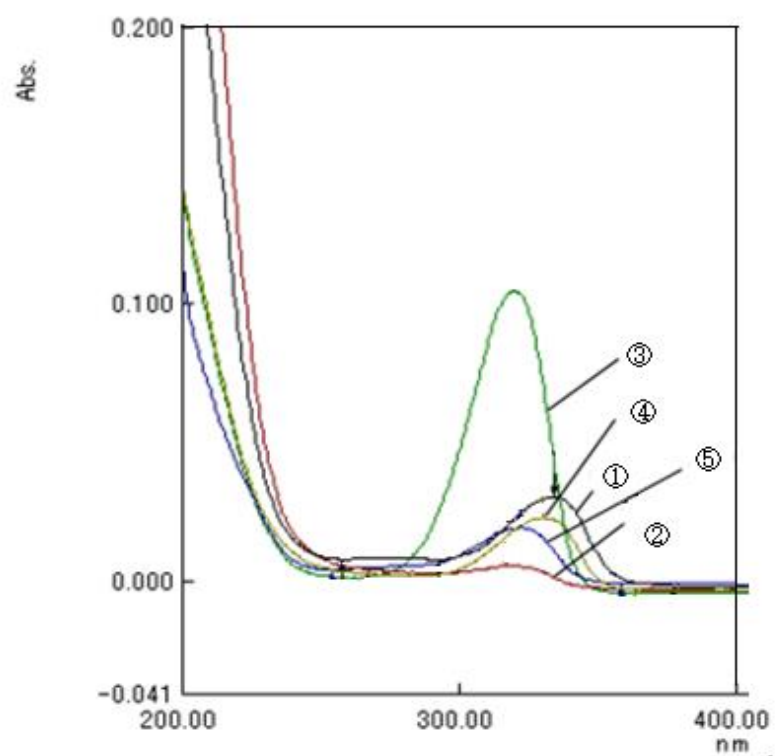


図 3-2-1 各フラクションの吸収スペクトル

表 3-2-1 各フラクションの吸光度と波長

サンプル	最大吸収波長 (nm)	吸光度
S ①	334.5	0.03
S ②	316.5	0.005
S ③	319.5	0.104
S ④	330	0.023
S ⑤	322	0.019

第三節 NMR による構造の確認

はじめに

前節までの結果より、スサビノリ 80% MeOH 溶出画分から HPLC で精製したフラクションのうち、S③が最も多い MAA を含んでいると考えられた。そこで本節では、核磁気共鳴吸収 (NMR) スペクトルの解析によって、S③およびその関連するフラクションの構造を推定した。

方法

(1) ^1H 核磁気共鳴スペクトル (^1H NMR)

600MHz Bruker を用いて測定し、以下の様式で記載した。

^1H NMR (測定周波数、測定溶媒)

化学シフト値は測定溶媒の残留プロトンのシグナルを内部標準[CD_2HDO (3.31 ppm)] として ppm で記載した。

(2) ^{13}C 核磁気共鳴スペクトル (^{13}C NMR)

150 MHz Bruker を用いて測定し、以下の様式で記載した。

^{13}C NMR (測定周波数、測定溶媒)

化学シフト値は測定溶媒のシグナルを内部標準 $^{13}\text{CD}_2\text{OD}$ (49.0 ppm) として ppm で記載した。多重度は HMQC スペクトルより決定した。

(3) 二次元核磁気共鳴スペクトル

600MHz Bruker を用いて、以下のデータポイント数および J 値で測定した。

(a) COSY : (1024×256) または (512×256)

(b) HMQC、HSQC : (1024×128) または (512×128)、 $^1\text{H}_{\text{CH}} = 140 \text{ Hz}$

(c) HMBC : (1024×128) または (512×128)、 $^{2,3}J_{\text{CH}} = 8 \text{ Hz}$

結果・考察

スサビノリには porphyra-334 という MAA が多く含まれているため、カーボン NMR において 160 ppm 付近に 2 つ、170 ppm 付近に 2 つのカーボンが観測されることが予想された (Torres et al., 2006)。図 3-3-1 にスサビノリ由来フラクション S③の NMR スペクトルを示したが、予想されたシグナルは観測されなかった。また第三章第一節で、HPLC にて精製したフラクションの DPPH ラジカル消去能を確認し、一番消去能が高いピーク S③が MAA であるかを確認する必要があると考えた。よって、NMR によって解析した。カーボン NMR のスペクトルを拡大した結果を図 3-3-2 に示した。ここには、予想されたシグナルの他マイナー成分由来だと考えられるいくつかのシグナルが観測された。表 3-3-1 には porphyra-334 と S③のマイナー成分のカーボン NMR のケミカルシフトをまとめた。両者はよく一致していることから、S③にはマイナー成分として porphyra-334 (図 3-3-3) が含まれていることが明らかになった。ピーク比から見積もられる含有比は 5% 以下であった。

次に図 3-3-1 の NMR スペクトルを解析し、文献値と比較した結果、主要な物質はガラクトシルグリセロール (Galactosyl glycerol) であると考えられた (Bondu, 2008)。得られたケミカルシフト値を表 3-3-2 にまとめた。よって、今回のサンプルの主要物質は GG であることが分かった。ガラクトシルグリセロールにはフロリシド (図 3-3-4) とイソフロリシド (図 3-3-5) の異性体が知られるが、スサビノリからは両者の 1:1 の混合物が報告されており、この混合物を GG として定義されている (Noda, 1981)。フロリシドとイソフロリシドは分離していないが、スペクトルから推定される GG の純度は 95% 以上であった。

HPLC で分画した他のフラクションについても NMR を測定してみたが、高純度の MAA を含むと考えられるものは見つからなかった。また HPLC の前の段階である 80% MeOH 溶出画分についても NMR に供した (図 3-3-6)。解析の結果、ここでも GG が 95% を占めており、この精製段階においても MAA を得られていないことが示された。これらの結果より、抗酸化能と UV=330 nm の吸収は MAA 精製の指標としては最適ではないと考えられる。

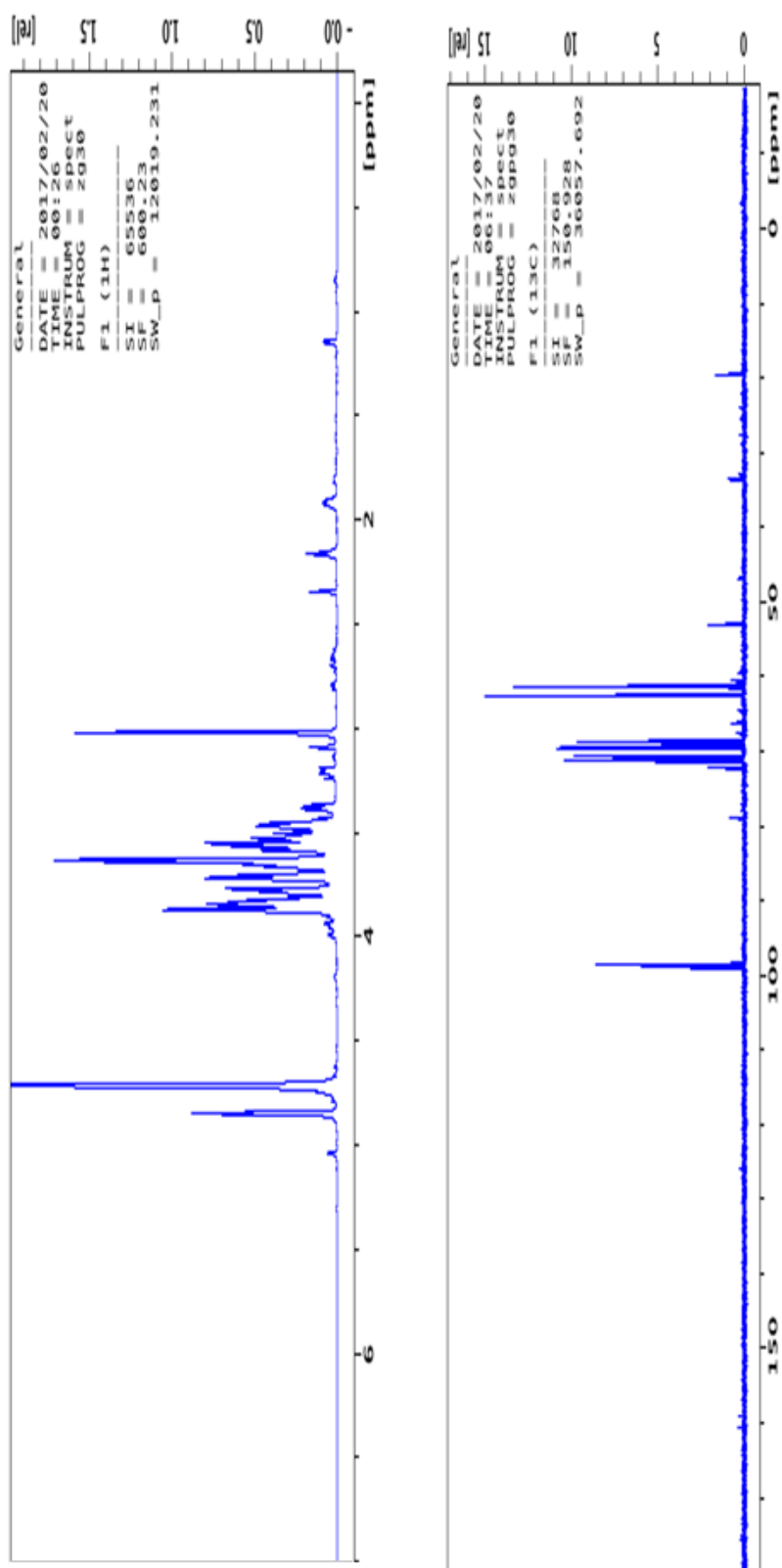


図 3-3-1 スサビノリ HPLC で分離した S③の NMR スペクトル (上:プロトン, 600 MHz, 重水) (下:カーボン, 150 MHz, 重水)

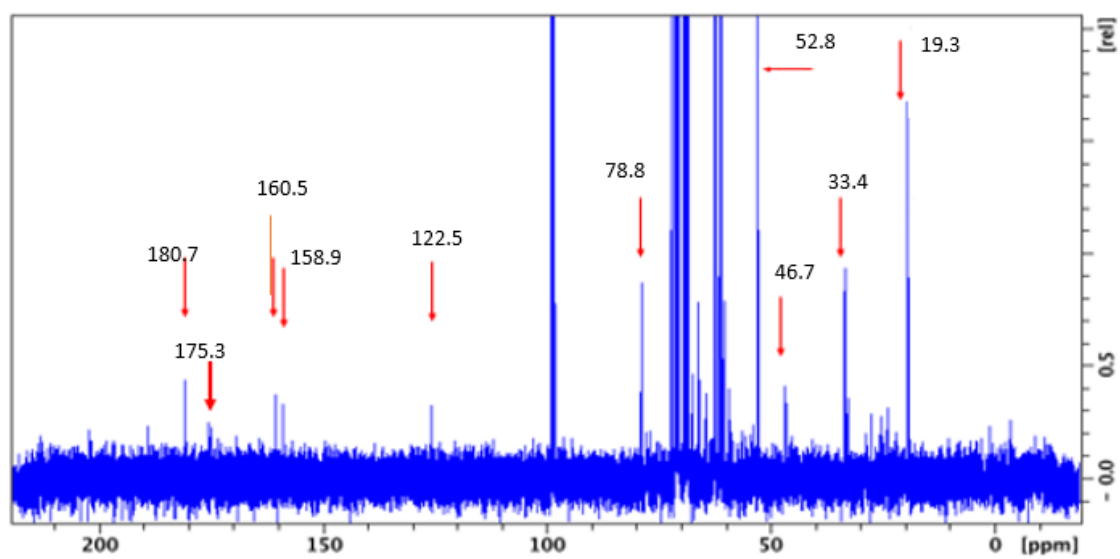


図 3-3-2 スサビノリ HPLC で分画した S③の NMR スペクトル 拡大図

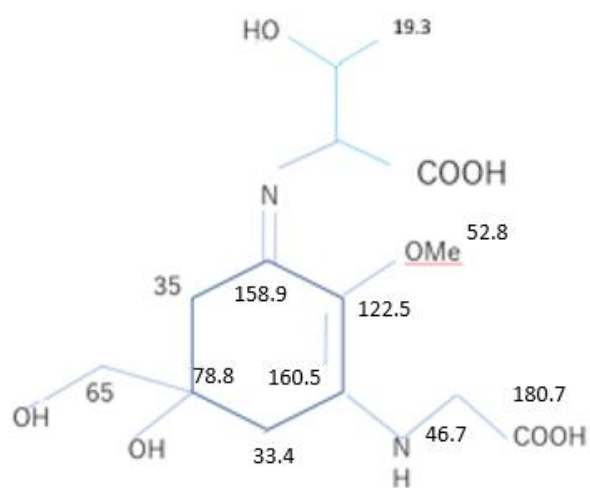


図 3-3-3 S③のマイナー成分の推定構造

表 3-3-1 porphyra-334 と S③ のマイナー成分の ^{13}C NMR データ (ppm)

Position	Porphyra-334	S③マイナー成分
1	161.6	158.9
2	126	122.5
3	163.2	160.5
4	32.5	33.4
5	71.3	72
6	33	33.4
7	67.1	68
8	59	52.8
9	47	46.7
10	177.6	175.3
11	64	66
12	178	180.7
13	68	66
14	19	19.3

表 3-3-2 グリセロールガラクトシドと S③の主成分の ^{13}C NMR データ

化合物	化学シフト (ppm)								
	ガラクトース残基						グリセロール残基		
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-1'	C-2'	C-3'
フロリシド (2-O- α -Gal-G)	99.2	69.6	70.5	70.4	72.2	62.3	62.5	79.9	61.5
イソフロリシド (1-O- α -Gal-S-G)	99.6	69.8	70.6	70.4	72.1	62.3	71.6	69.8	63.7
S③	98.7	69.2	68.4	70.4	70.9	62.4	62.3	78.7	61.2
	98.8	68.5	70.9	69.4	70.6	62.4	72.0	68.8	62.5

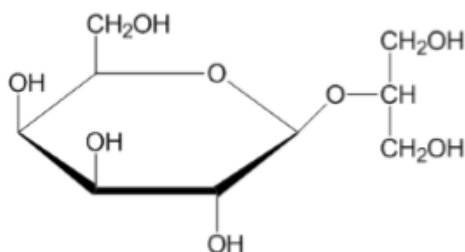


図 3-3-4 フロリシド (2-O- β -D-ガラクトシルグリセロール, 2-O- β -Gal-G)

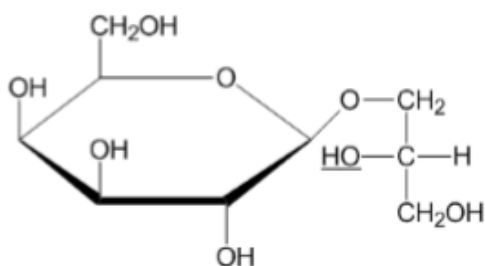


図 3-3-5 イソフロリシド (1-O- β -D-ガラクトシルグリセロール, 1-O- β -Gal-S-G)

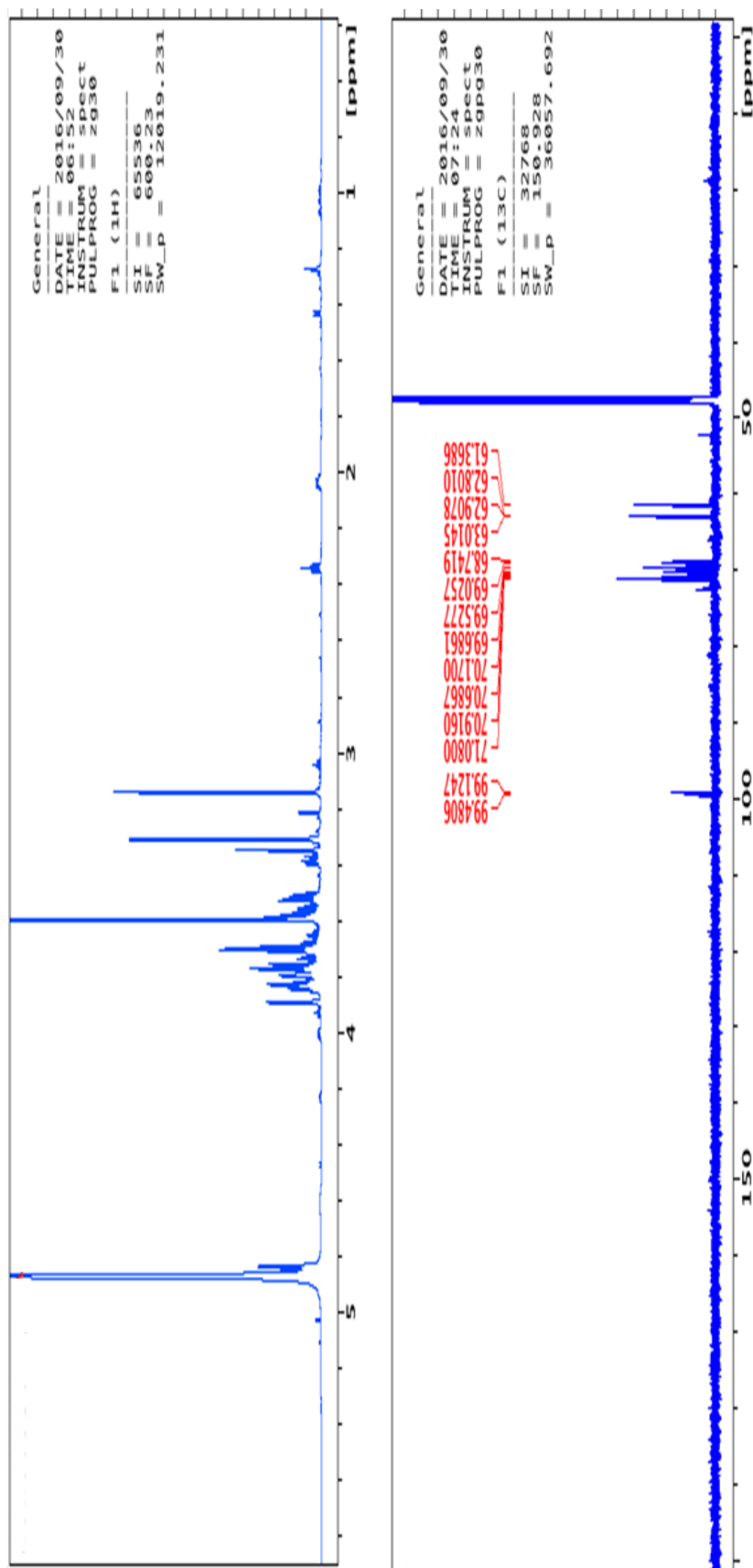


図 3-3-6 スサビノリ 80% MeOH 溶出画分の NMR スペクトル (上:プロトン, 600 MHz, 重水) (下:カーボン, 150 MHz, 重メタノール)

第四章 総括

本研究では MAA による生理作用を確認することを目指して、MAA を精製することを試みた。これまでの文献では、MAA を精製し、MAA であると判断する基準は、HPLC による分析と吸光度測定による最大吸収波長 330 nm 付近の確認によって行われることが多い。第二章においては、MAA の精製に一般的に用いられている方法である、フォルチ法、活性炭カラムクロマト、HPLC によって MAA を含むと思われるフラクションを精製した。第三章においては、各フラクションのうち MAA を高純度で含むことを評価するために、抗酸化能および 330 nm 付近の吸収極大について確認し、最も有望だと判断されたスサビノリ由来の画分 S③について、NMR を測定した。その結果、S③には MAA は数% しか含まれておらず、95% 以上の純度でガラクトシルグリセロール (GG) を主成分として含んでいることが明らかとなった。

本研究で目指すところは、MAA が精製できなかったために達成されていないが、その過程において、精製された GG を得た。この GG は、スサビノリの成分として知られており、整腸作用 (Muraoka, 2008) や、浮腫形成抑制作用 (Cateni, 2004) が報告されているが、330 nm にも吸収極大を有し、抗酸化作用を示すことを明示した報告はこれまでに見られない。本研究により見出された知見である。すなわち、実際の MAA の精製操作においては GG を含む可能性が十分にあり、機器分析による純度確認が不十分の場合には、両者の生理機能を混同している可能性が否定できない。過去に MAA の生理機能の評価した論文の中には、抗酸化能や UV 波長のみで MAA の純度を推定しているものも見られるため、一部の報告については検証が必要であると考えられる。

本研究では十分量の MAA が得られなかったため、生理作用の検討には至らなかったが、一方で同じスサビノリの抽出物から MAA と同じ方法で単離された GG に関する新しい知見を示した。これらの成果は関連分野における、今後の研究に大きく貢献すると考えている。

謝辞

本研究を進めるにあたり、ご指導頂き、また本論文のご校閲とご教示を賜りました東京海洋大学海洋科学部食品生産科学科食品栄養化学研究室准教授小山智之先生、同教授大島敏明先生、同助教長阪玲子先生に深く感謝の意を申し上げます。

アメフラシの卵のサンプリングに協力して頂いた、細田萌菜美さん、山田智子さんに感謝の意を表します。

そして、日頃より有益な議論をして頂いた食品栄養化学研究室内の皆様に感謝致します。

参考文献

- Anja, H., Kathrin, B., Ulf, K., Daniel, R., Markus, G., Analysis of Mycosporine-Like Amino Acids in Selected Algae and Cyanobacteria by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography and a Novel MAA from the Red Alga *Catenella repens*. Mar. Drugs, 13(10), 6291-6305 (2015)
- Bottier, C., Gean, J., Artzner, F., Desbat, B., Pezolet, M., Renault, A., Marion, D., Vie, V., Galactosyl headgroup interactions control the molecular packing of wheat lipids in Langmuir films and in hydrated liquid-crystalline mesophases. Biochimica et biophysica Acta, 1768, 1526-1540 (2007)
- Brattin, W.J., Glende, E.A.Jr., Recknagel, R. O., Pathological mechanisms in carbon tetrachloride hepatotoxicity. J Free Radic Biol Med. 1, 27-38 (1985)
- Carefoot, H. T., Karentz, D., Pennings, C. S., Young, L. C., Distribution of mycosporine-like amino acids in the sea hare *Aplysia dactylomela*: effect of diet on amounts and types sequestered over time in tissues and spawn. Comparative Biochemistry and Physiology Part, C 126, 91–104 (2000)
- Cateni, F., Falsone, G., Zilic, J., Bonivento, P., Zacchigna, M., Zigon, D., Sosa, S., Altinier, G., Glyceroglycolipids from *Euphorbia nicaeensis* all. with antiinflammatory activity. Arkivoc. 54-65 (2004)
- Chopra, P., Roy, S., Ramalingaswami, V., Nayak, N. C., Mechanism of carbon tetrachloride hepatotoxicity. An in vivo study of its molecular basis in rats and monkeys. Lab Invest 26, 716-727 (1972)
- Dunlap, C. W., Shick, M. J., Ultraviolet radiation-absorbing mycosporine-like amino acids in coral reef organisms. A biochemical and environmental perspective, J. Phycol., 34: 418-430 (1998)

- Dunlap, C. W., Yamamoto, Y., Small molecule antioxidants in marine organism antioxidant activity of mycosporine-glycine. *Comp. Physiol.* , 112B: 105-114 (1995)
- Forch, J. B., Less, M., Sloane, Stanley, G. H., A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226, 497-509 (1957)
- Hoyer, K., Karsten, U., Sawall, T., Wiencke, C., Photoprotective substances in Antarctic macroalgae and their variation with respect to depth distribution, different tissues and developmental stages. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 211, 117-129 (2001)
- IARC (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER), IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Solar and Ultraviolet Radiation. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon, France 55:1-316 (1992)
- Klumpp, W. D., Bayne, L. B., HawMekins, S. J. A., Nutrition of the giant clam *Tridacna gigas*(L). I. Contribution of filter feeding and photosynthates to respiration and growth. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 155:105-122 (1992)
- Meeting of the NTP Board of Scientific Counselors Report on Carcinogens Subcommittee. Broad-Spectrum Ultraviolet (UV) Radiation and UVA, and UVB, and UVC. 13-14 (2000)
- Meng, J., Rosell, K. G., Srivastava, L. M., Chemical characterization of floridosides from *Porphyra perforate*, *Carbohydrate Research* , 161. 171-180 (1987)
- Muraoka, T., Ishihara, K., Oyamada, C., Kunitake H., Hirayama, I., Kimura, T., Fermentation Properties of Low-Quality Red Alga *Susabinori Porphyra yezoensis* by intestinal Bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72 (7), 1731-1739 (2008)
- Nakamura, S., Chemistry of Oxygen Species and Antioxidants, Department of Chemistry, Nippon Medical School, 9, 164 (2013)
- Noda, H., Amano, H., Arashime, K., Hashimoto, S., Nishizawa, K., Antitumour activity of polysaccharides and lipids from marine algae. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55, 1265-1271 (1989).

- Osumi, Y., Antitumor Activity of Oligosaccharides Derived from *Porphyra yezoensis* Porphyran. 64, 847-853(1998)
- Recknagel, O. R., Carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pharmacol Rev.* 19, 145-208 (1967)
- Ren, D. H., Noda, H., Amano, H., Nishino, T., Nisizawa, K., Study on antihypertensive and antihyperlipedemic effects of marine algae. *Fisheries Sci.*, 60,83-88 (1994)
- Sakamoto, N., Enomoto, N., Studies on Fat-Soluble substances of Laver (Susabinori, *Porphyra yezoensis*) IV Identification of steryl glycolipids. *Received June.*, 45,127-132 (1978)
- Schmid, D., Schurc, C., Zulli, F., Mycosporine-like Amino Acids from Red Algae Protect against Premature Skin-Aging. *EURO COSMETICS*, 4-9 (2006)
- Shick, M. J., Dunlap, C. W., Mycosporine-like amino acids and related Gadusols. biosynthesis, acumulation, and UV-protective functions in aquatic organisms: *Annu. Rev. Physiol.*, 64, 223-262 (2002)
- Smith, C. R., Baker, S. K., Penetration of UV-B and biologically effective dose-rates in natural waters. *Photochem. Photobiol.*, 29: 311-323 (1979)
- Takano, S., Nakanishi, A., Uemura, D., Hirata, Y., Isolation and structure of a 334 nm UV-absorbing substance, pophyra-334 from the red alga *Porphyra tenera* Kjellman. *Chemistry Let.*, 419-420 (1979)
- Takenaka, F., Uchiyama, H., Imamura, T., Identification of α -D-glucosylglycerol in sake, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* , 64:378-385 (2000)
- Torres, A., Enk, D. C., Hochberg, M., Srebnik, M., Porphyra-334, a potentioal natural source for UVA protective sunscreens. *Photochem. Photobiol*, 5, 431-435 (2006)
- Williamson, E.J., Nys, D. R., Kumar, N., Carson, G. D., Steinberg, D. P., Induction of metamorphosis in the sea urchin holopneustes purpurascens by a metabolite complex from the algal host delisea pulchra. *Biol. Bull.* , 198, 332-345(2000)

荒井孝之，西島美由紀，足立恭子，佐野浩．微生物によるマイコスポリン様アミノ酸の製造方法
(1994)

石倉正治，丸山正．共生藻を持つ群体ホヤおよびシャコガイの紫外線防御 海洋バイオテクノロジー (13) 5-8 (2002)

石原賢司．ホタテガイ卵巣から得られる紫外線吸収アミノ酸 農林水産技術研究ジャーナル 28,
6, 33-37 (2005)

石原賢司，小山田千秋．繊維芽細胞用培地の構成原料として用いるためのマイコスポリン様アミ
ノ酸よりなるか 又はマイコスポリン様アミノ酸を有効成分とする繊維芽細胞増殖促進剤 特許第
4973975 独立行政法人水産総合研究センター (2012)

金田尚志，徳田節子，荒井君江．水産物のコレステロール代謝におよぼす影響に関する研究 I
食用海藻の効果.日水誌、29,1020-1023 (1963)

金田尚志，ベントラ V カマサストリ，徳田節子．水産物のコレステロール代謝におよぼす影響に
関する研究 V 食用海藻の効果 日水誌 31,1026-1029 (1965)

近藤矩朗．成層圏オゾン層破壊による紫外線増加の植物への影響 大気汚染学会誌 29 第6号
(1994)

財団法人佐賀県地域産業支援センター．抗酸化化合物、抗酸化性藻類エキス、およびそれらの
製造方法 (2008)

榊原正樹，鳥井美帆，宮本正紀．グリコシル基を有するマイコスポリン様アミノ酸誘導体及びその
製造方法 DIC 株式会社 (2009)

田口哲．オゾンホール拡大による紫外線増加と海洋生態系 大気汚染学会誌 28 A87～A97
(1993)

棚橋伸行，長太のどか，長村洋一．四塩化炭素で誘発された急性肝障害に及ぼす栄養素の防
御作用 鈴鹿医療科学大学紀要 22, 19-29 (2015)

辻悦子, 辻啓介, 鈴木慎次郎. 多糖類とコレステロール代謝、各種多糖類がシロネズミの血清および肝臓コレステロール値に及ぼす影響 栄養学雑誌 第6報 33, 273-281 (1975)

辻野勇, 斎藤恒行. 海藻の特殊成分の研究、紅藻に特有な紫外線吸収物質について 北大水産彙報 12:49-58 (1961)

DIC 株式会社. グリコシル基を有するマイコスポリン様アミノ酸誘導体及びその製造方法 (2007)

中川浩毅, 濱洋一郎. スサビノリ・ポルフィランの性質と構造並びにその効率的製造法と利用

中沢昭三, 黒田浩之, 安部史紀, 西野武志, 大槻雅子, 梅崎勇. 海藻成分の抗腫瘍作用に関する研究 第1報 *Chemotherapy*, 22, 1435-1442 (1974).

藤原昌高. 美味しいマイナー魚介図鑑 マイナビ出版 16-17 (2015)

前田沙矢香, 菅原達也, 平田孝, 萩野浩志. スサビノリ由来ポルフィラ 334 の抗酸化作用 株式会社白子(2006)

森崎尚子, 高橋信孝, 大岳望. 天然有機化合物の分離法 II 98-105 (1967)

横山亜紀子, 原慶明. チノリモ目藻類(紅色植物門)における紫外線吸収物質, マイコスポリン様アミノ酸の出現分布と組成、特にそれらの分類・系統学的意義について *Bull. of Yamagata Univ. Nat. Sci.*, Vol. 16, No. 4, Feb (2008)

和光純薬工業株式会社. トランスアミナーゼ C II-テストワコー (2008)

環境省 https://www.env.go.jp/water/heisa/heisa_net/setouchiNet/seto/setonaikai/clm15.html

